

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Dilakukan identifikasi sampel tanaman jeruk nipis pada tanggal 19 Juni 2023 di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan keterangan hasil 289/Lab.Bio/B/IV/2023 menyatakan bahwa sampel yang digunakan adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada Lampiran 4.

2. Preparasi Sampel

Hasil penimbangan simplisia segar, setelah pengeringan dan penyerbukan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Penimbangan Simplisia

Jenis Sampel	Sampel Segar (Kg)	Sampel Kering (g)	Sampel Hasil Penyerbukan (g)
Kulit Buah	3	449	224
Daun	3	673	557

Hasil rendemen ekstrak etanol kulit buah dan ekstrak etanol daun jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Kulit Buah dan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Sampel	Berat Simplisia Serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	% rendemen (%b/b)
Ekstrak Kulit buah jeruk Nipis	150	28,86	19,24
Ekstrak Daun jeruk nipis	150	35,71	23,81

3. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan menggunakan alat indera untuk mengamati warna, tekstur, rasa dan bau. Hasil uji organoleptik disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Organoleptik

Uji Organoleptik	Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	Referensi (Silverman et al., 2023)	Ekstrak Daun Jeruk Nipis	Referensi (Pratiwi et al., 2021)
Warna	Hijau Kekuningan	Hijau kekuningan	Coklat Kekuningan	Coklat kekuningan
Tekstur	Kental	Kental	Kental	Kental
Rasa	Pahit	Pahit	Pahit	Pahit
Bau	Khas	Khas	Khas	Khas

4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis dengan menggunakan uji tabung. Uji skrining fitokimia mencakup pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Skrining Fitokimia

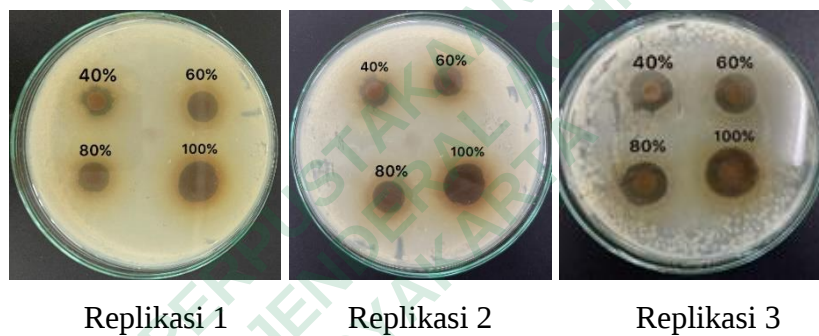
Golongan senyawa	Ekstrak Kulit	Sampel Ekstrak Daun	Referensi
Alkaloid	+	+	(+)
	+	+	(Malik et al., 2016)
	+	+	
Flavonoid	+	+	(+)
			(Fajriaty et al., 2018)
Saponin	+	+	(+)
			(Illing, 2017)

Golongan senyawa	Sampel		Referensi
	Esktrak Kulit	Ekstrak Daun	
Tanin	+	+	(+) (Illing, 2017)
Terpenoid	+	+	(+) (Nafisah <i>et al.</i> , 2014)

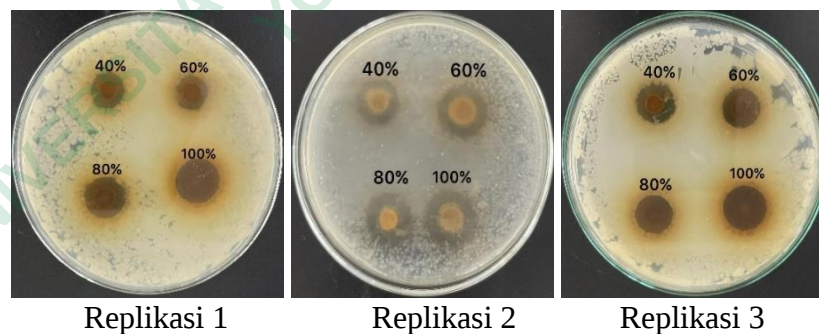
Keterangan: (+) Positif mengandung senyawa, (-) Tidak mengandung senyawa

5. Uji Aktivitas Antibakteri

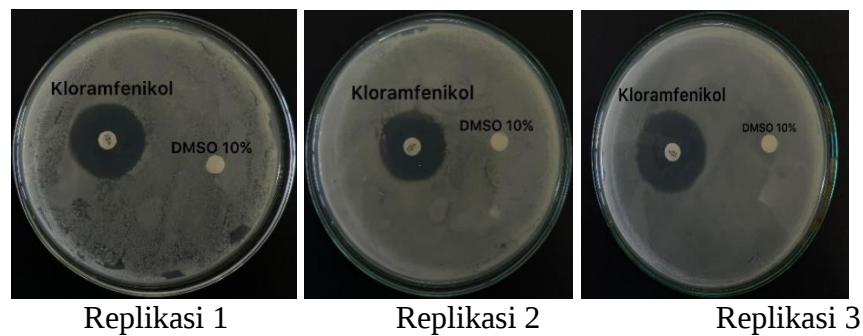
Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Hasil pengujian aktivitas antibakteri kelompok ekstrak dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 7, Gambar 8, dan Gambar 9.



Gambar 7. Zona Hambat Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Nipis



Gambar 8. Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

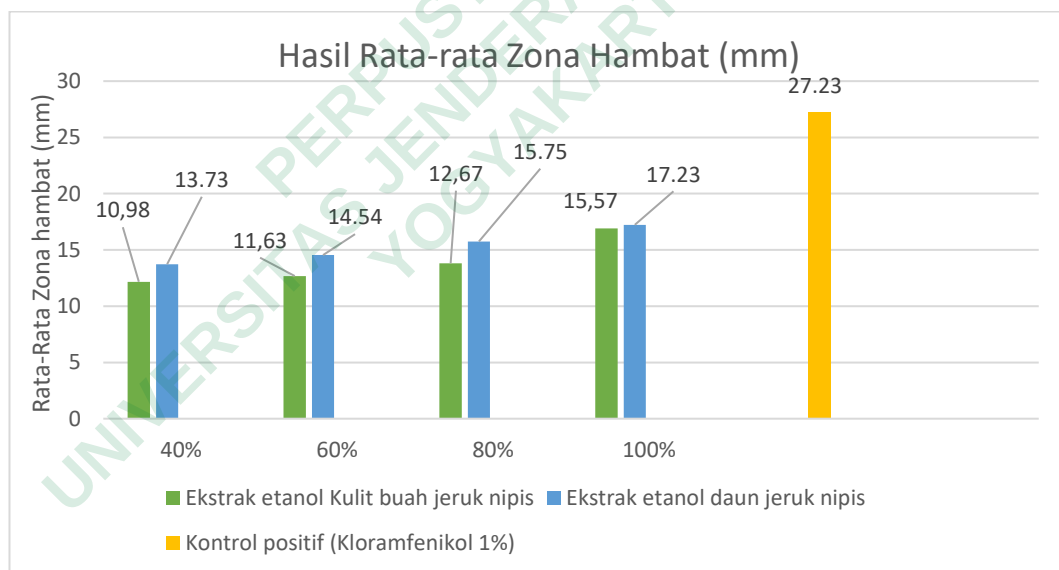


Gambar 9. Zona Hambat Kontrol Positif

Keterangan gambar:

- 40% : Ekstrak etanol sampel konsentrasi 40%
- 60% : Ekstrak etanol sampel konsentrasi 60%
- 80% : Ekstrak etanol sampel konsentrasi 80%
- 100% : Ekstrak etanol sampel konsentrasi 100%

Dilakukan pengukuran diameter zona hambat secara vertikal, diagonal dan horizontal menggunakan jangka sorong (Lampiran 10). Hasil rata-rata pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil Rata-rata Zona Hambat

6. Analisa Data

Hasil zona hambat bakteri yang didapatkan dianalisis secara statistika menggunakan aplikasi SPSS versi 25. Hasil analisis statistika disajikan pada Tabel 7, 8, dan 9.

Table 7. Hasil Analisis Data Zona Hambat Kulit Buah

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji One Way ANOVA
40%	0,067*	0,061**	0,001***
60%	0,265*		
80%	0,279*		
100%	0,583*		

Keterangan:

(*) Terdistribusi Normal

(**) Data Homogen

(***) Berbeda Signifikan

Table 8. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Daun Jeruk Nipis

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji One Way ANOVA
40%	0,982*	0,966**	0,330
60%	0,936*		
80%	0,066*		
100%	0,623*		

Keterangan:

(*) Terdistribusi Normal

(**) Data Homogen

(***) Berbeda Signifikan

Table 9. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Kulit Buah dan Daun Jeruk Nipis

Ekstrak	Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji One Way ANOVA
Kulit Buah Jeruk nipis	40%	0,98*	0,13**	0,004***
	60%	0,93*		
	80%	0,06*		
	100%	0,62*		
Daun Jeruk nipis	40%	0,06*		
	60%	0,26*		
	80%	0,27*		
	100%	0,58*		

Keterangan:

(*) Terdistribusi Normal

(**) Data Homogen

(***) Berbeda Signifikan

B. Pembahasan

Penelitian ini mengeksplorasi aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis melalui desain eksperimental laboratorium. Uji determinasi dilakukan terhadap tanaman yang akan digunakan pada penelitian ini. Uji determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah benar jeruk nipis dengan spesies *Citrus aurantifolia* (Lampiran 4).

Kulit buah dan daun jeruk nipis masing-masing sebanyak 3 kg disortir dan dicuci menggunakan air yang mengalir. Sortasi basah dilakukan guna memisahkan kulit buah dan daun yang rusak maupun daun yang ditumbuhi jamur, sementara pencucian bertujuan untuk menghilangkan kontaminan dari sampel kulit buah maupun daun jeruk nipis. Tahap selanjutnya adalah mengeringkan sampel menggunakan oven pada suhu 40°C karena suhu yang lebih tinggi dapat merusak senyawa flavonoid dalam kulit buah dan daun jeruk nipis (Chairunnisa *et al.*, 2019). Proses pengeringan dilakukan guna mengurangi kadar air pada sampel sehingga sampel tidak rentan terhadap pertumbuhan mikroba. Kulit buah dan daun jeruk nipis yang sudah kering ditandai dengan kondisi simplisia yang mudah hancur ketika diremas (Sekarsari *et al.*, 2019). Proses selanjutnya yaitu penyerbukan menggunakan blender guna untuk memperkecil ukuran partikel dan meningkatkan kontak sampel dengan pelarut pada saat proses ekstraksi. Serbuk kulit buah dan daun jeruk diayak dengan ayakan mesh 40 untuk memastikan ukuran partikel sampel memiliki ukuran yang seragam sehingga memudahkan saat proses ekstraksi. Setelah itu, dilakukan proses ekstraksi untuk menarik senyawa metabolit sekunder terutama senyawa flavonoid dari kulit buah dan daun jeruk nipis dengan menggunakan pelarut 70%. Etanol 70% dipilih sebagai pelarut pada proses ekstraksi karena etanol 70% bersifat universal sehingga dapat menarik sebagian besar senyawa utamanya senyawa yang bersifat polar, salah satunya yaitu senyawa flavonoid (Pertiwi *et al.*, 2022).

Proses ekstraksi senyawa metabolit sekunder pada kulit buah dan daun jeruk nipis dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Pemilihan metode maserasi ini karena merupakan metode ekstraksi dingin dengan

menggunakan peralatan sederhana, sehingga selama proses ekstraksi kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid pada kulit buah dan daun jeruk nipis yang tidak tahan panas tidak akan rusak (Puspitasari *et al.*, 2017). Pengadukan bertujuan untuk pengadukan yang berulang agar dapat mempercepat waktu larutan penyari dalam mengekstraksi sampel. Hal tersebut dimanfaatkan bagi simplisia atau bahan alam yang tidak tahan panas untuk menghindari rusaknya atau terurai beberapa komponen kimia aktif (Handoyo, 2020). Remaserasi pada proses maserasi dilakukan untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi. Selanjutnya dilakukan proses pengentalan ekstrak dengan suhu 40°C, penggunaan suhu ini agar tidak merusak senyawa metabolit yang terdapat pada ekstrak seperti senyawa flavonoid.

Hasil ekstraksi kulit buah dan daun jeruk nipis berupa ekstrak kental dengan nilai rendemen memenuhi persyaratan rendemen yang baik yaitu diatas 15% (Tabel 4). Hasil rendemen pada ekstrak etanol daun jeruk nipis menunjukkan nilai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai rendemen pada ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis, hal tersebut didukung oleh penelitian Herlina *et al.*, (2020) yang menunjukkan bahwa daun jeruk nipis memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan kulit buah jeruk nipis sehingga hal tersebut dapat berpengaruh pada jumlah rendemen yang dihasilkan.

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis kemudian dilakukan uji organoleptik melalui pengamatan terhadap warna, tekstur, rasa dan bau. Hasil dari pengamatan organoleptik terhadap ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis menunjukkan ekstrak berwarna hijau kekuningan dengan tekstur kental, rasa pahit dan bau khas, sedangkan hasil pengamatan pada ekstrak etanol daun jeruk nipis menunjukkan ekstrak berwarna coklat kekuningan dengan tekstur kental, berasa pahit dan berbau khas. Hasil uji organoleptik ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Pratiwi *et al.*,(2021) dan Silverman *et al.*,(2023) yaitu ekstrak etanol kulit buah berwarna hijau kekuningan, tekstur kental, rasa pahit serta bau khas, sedangkan pada ekstrak etanol daun jeruk nipis berwarna coklat kekuningan, tekstur kental, rasa pahit dan bau khas berdasarkan (Tabel 5). Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis selanjutnya dilakukan skrining fitokimia yang bertujuan untuk melihat kandungan senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol kulit buah

dan daun jeruk nipis. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Silverman *et al.*, (2023) dan Pratiwi *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa kulit buah dan daun jeruk nipis mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tanin, dan saponin (Tabel 6).

Pada uji alkaloid menggunakan tiga pereaksi yaitu mayer, wagner, dan dragendroff, hasil identifikasi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis menunjukkan hasil positif pada dua pereaksi yaitu wagner dan dragendroff, sedangkan pada ekstrak daun jeruk nipis menunjukkan hasil positif pada ketiga pereaksi. Menurut Aprilia & Yanti (2019) terbentuknya endapan pada pengujian alkaloid diakibatkan oleh atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas yang berikatan kovalen koordinat dengan ion logam sehingga membentuk endapan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Siregar *et al.*, (2020) dan Sari & Asri (2022) mendukung hasil penelitian ini, dimana hasil penelitian membuktikan adanya senyawa alkaloid pada ekstrak kulit buah dan daun jeruk nipis.

Uji kandungan metabolit sekunder lainnya yaitu uji kandungan flavonoid. Uji flavonoid menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna kuning hingga jingga. Mekanisme terjadi perubahan warna larutan tersebut disebabkan karena adanya reaksi reduksi antara serbuk Mg dan HCl pekat yang digunakan (Harbone, 1987). Studi yang dilakukan Siregar *et al.*, (2020) dan Sari & Asri (2022) menunjukkan hal serupa dimana ekstrak kulit buah dan daun jeruk nipis mengalami perubahan warna kuning dimana menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid golongan flavonol (Risma *et al.*, 2023).

Pada uji selanjutnya yaitu uji kandungan senyawa terpenoid menunjukkan ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis mengandung senyawa terpenoid. Pada uji terpenoid dibuktikan dengan adanya reaksi perubahan warna larutan menjadi warna jingga. Mekanisme terjadinya perubahan warna pada uji tersebut disebabkan oleh gugus yang berbeda pada atom C keempat. Hasil pengujian yang dilakukan oleh Marlina *et al.*, (2011) dan Widiyari (2021) menunjukkan hasil serupa dimana kulit buah dan daun jeruk nipis mengandung senyawa terpenoid.

Pada pengujian kandungan tanin menunjukkan ekstrak etanol kulit buah dan ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung tannin dengan hasil reaksi

terbentuknya larutan berwarna biru kehitaman. Perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman disebabkan karena adanya FeCl_3 , dimana akan bereaksi membentuk gugus fenol sehingga mengakibatkan larutan menjadi warna biru kehitaman (Arifuddin *et al.*, 2020). Hasil pengujian ini didukung oleh penelitian Siregar *et al.*, (2020) dan Sari & Asri (2022) yang menunjukkan adanya kandungan senyawa tanin pada kulit buah dan daun jeruk nipis. Berdasarkan hasil perubahan warna biru kehitaman menandakan sampel mengandung tanin terhidrolisis (Risma *et al.*, 2023)

Pada pengujian kandungan saponin menunjukkan ekstrak etanol kulit buah dan ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung saponin dengan hasil reaksi terdapat buih yang stabil selama 10 menit. Mekanisme terjadinya buih yang stabil dikarenakan adanya glikosida yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan buih dalam air yang kemudian terhidrolisis menjadi glukosa dan bahan lain (Marliana *et al.*, 2005). Menurut studi yang telah dilakukan oleh Sari & Asri (2022) membuktikan bahwa pada ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis positif mempunyai senyawa saponin.

Pengujian yang terakhir dilakukan yaitu uji aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk membandingkan sifat antibakteri ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Uji aktivitas antibakteri menggunakan empat seri konsentrasi pada kelompok perlakuan yaitu 40%, 60%, 80% dan 100% untuk melihat adanya pengaruh dari seri konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Kelompok kontrol menggunakan kontrol positif Kloramfenikol ($30\mu\text{g}/\text{disc}$) dan kontrol negatif DMSO 10%. Alasan menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif karena kloramfenikol merupakan antibiotik bakteriostatik berspektrum luas yang aktif terhadap organisme-organisme aerobik dan anaerobik gram positif maupun negatif (Anatje J. Pattipeilohy *et al.*, 2022). Penggunaan pelarut DMSO 10% dalam penelitian ini didasarkan fakta bahwa DMSO merupakan pelarut yang sangat baik terhadap senyawa polar maupun non polar dan tidak memiliki sifat bakterisidal (Huda *et al.*, 2019), sehingga penggunaan pelarut DMSO dapat melarutkan ekstrak dengan baik dan tidak mengganggu hasil pada proses pengujian aktivitas antibakteri. Hasil pengujian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak

etanol kulit buah dan daun jeruk nipis pada konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada hasil perbandingan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk (Gambar 10.) ekstrak etanol daun jeruk nipis menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis. Terdapat perbedaan hasil pengujian aktivitas antibakteri pada setiap replikasi dikarenakan terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi, diantaranya yaitu suhu inkubasi, kekeruhan suspensi bakteri, sampel, sampel yang tidak terdifusi dengan baik pada kertas cakram dan ketebalan media. Faktor ketebalan media berpengaruh dikarenakan bakteri mendapatkan nutrisi lebih untuk berkembang, oleh karena itu terdapat perbedaan yang diantara setiap replikasi. Faktor kekeruhan suspensi juga mempengaruhi karena semakin banyak bakteri yang terdapat pada larutan dapat mempengaruhi hasil zona hambat pada setiap replikasi.

Hasil uji statistika yang dilakukan menunjukkan bahwa pada uji aktivitas antibakteri kelompok ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok konsentrasi ekstrak yang diujikan. Sementara itu, hasil statistika pada hasil pengujian ekstrak etanol daun jeruk nipis menunjukkan hasil tidak adanya perbedaan yang signifikan antar variasi ekstrak yang diujikan. Selanjutnya analisis statistika dilakukan untuk melihat perbandingan aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada konsentrasi ekstrak daun 60% dan 60 % kulit serta 80% daun dan 80% kulit berdasarkan uji *post-hoc* yang dapat dilihat pada (Lampiran 11).

Hasil pada pengujian aktivitas antibakteri ini sejalan dengan pengujian skrining fitokimia yang menunjukkan bahwa senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun jeruk nipis lebih banyak dibandingkan pada ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis yang ditandai dengan semakin kuatnya intensitas warna yang dihasilkan pada uji tabung yang menjadi faktor utama yang menyebabkan zona hambat ekstrak etanol daun jeruk nipis lebih baik dibandingkan dengan zona hambat ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis. Kulit buah dan daun jeruk nipis memiliki senyawa metabolit sekunder yang digunakan sebagai antibakteri yaitu senyawa alkaloid, flavonoid,

terpenoid dan tanin. Mekanisme antibakteri dari senyawa alkaloid yaitu mengganggu bagian penyusun peptidoglikan sel bakteri, menyebabkan pembentukan lapisan dinding sel yang tidak sempurna (Evans & Cowan, 2016). Mekanisme antibakteri dari senyawa flavonoid yaitu membentuk kompleks protein antara protein ekstraseluler, protein yang dapat larut, dan dinding sel (Purbaya *et al.*, 2018). Mekanisme antibakteri senyawa terpenoid mengikat protein dan lipid pada membran sel dan bahkan menyebabkan sel lisis (Purbaya *et al.*, 2018). Sebaliknya, senyawa golongan tanin menginaktifkan enzim bakteri dan mencegah protein masuk ke lapisan dalam sel (Ngajow *et al.*, 2013).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANU
YOGYAKARTA